

B3

HIV-RESISTANT RECOMBINED MODIFIED ANTIBODY AND METHOD FOR PREPARING MODIFIED ANTIBODY**Publication number:** JP4141095**Publication date:** 1992-05-14**Inventor:** MAEDA HIROAKI; MATSUSHITA SHUZO; EDA YASUYUKI; KURUMI KAZUHIKO; TOKIYOSHI YUKIO; MARII EMU BENDEITSUKU**Applicant:** CHEMO SERO THERAPEUT RES INST**Classification:**

- international: G01N33/569; A61K39/395; A61P31/12; C07K14/00; C07K14/005; C07K14/155; C07K14/195; C07K16/00; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/577; C12R1/91; G01N33/569; A61K39/395; A61P31/00; C07K14/00; C07K14/005; C07K14/195; C07K16/00; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/577; (IPC1-7): A61K39/395; C07K15/04; C07K15/12; C07K15/28; C12N15/13; C12P21/08; G01N33/569; G01N33/577

- European:**Application number:** JP19900266091 19901002**Priority number(s):** JP19900266091 19901002

Report a data error here

Abstract of JP4141095

NEW MATERIAL: To provide the subject modified antibody H chain wherein the amino acid sequence of the complementarity-determining region (CDR) of a variable region and a part of amino acids at the N-terminal and/or C-terminal of a framework adjacent to the amino acid sequence are sequences originated from the monoclonal antibody of a mouse and wherein other framework regions are amino acid sequences originated from a human antibody. **USE:** The neutralization of HIV, etc.

PREPARATION: The modified antibody H chain is expressed from the fused gene of a mouse immunoglobulin gene with a human immunoglobulin gene by a genetic recombination technique.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-141095

⑤ Int. Cl.⁵

C 12 P 21/08
C 07 K 15/04

識別記号

庁内整理番号

8214-4B
7731-4H
8717-4B

④ 公開 平成4年(1992)5月14日

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全15頁)

⑬ 発明の名称 組換え抗HIV改変抗体および改変抗体の調製方法

⑭ 特 願 平2-266091

⑮ 出 願 平2(1990)10月2日

⑯ 発 明 者	前 田	浩 明	熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142 公団4-609
⑯ 発 明 者	松 下	修 三	熊本県熊本市水前寺2-22-22
⑯ 発 明 者	江 田	康 幸	熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88
⑯ 発 明 者	来 海	和 彦	熊本県熊本市京町本丁4-60
⑯ 発 明 者	時 吉	幸 男	熊本県熊本市若菜3丁目14-19
⑯ 発 明 者	マリー・エム・ベンデ イツク		イギリス国 ロンドン NW6 1TX、ウエスト・ハム ステツド、ソレント・ロード 64
⑰ 出 願 人	財団法人化学及血清療 法研究所		熊本県熊本市清水町大窪668番地

最終頁に続く

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

組換え抗HIV改変抗体および改変抗体の調製方法

2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)活性を有するヒト×マウス改変抗体H鎖であって、可変領域の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列とそれに隣接するフレームワーク領域(FR)のN末端および/またはC末端の一部のアミノ酸とがマウスモノクローナル抗体由来の配列であり、これ以外のフレームワーク領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であることを特徴とする組換え抗HIV改変抗体H鎖。

(2) 該マウス抗体由来のアミノ酸配列の領域が、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端側5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端側6個のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の組換え抗HIV改変抗体H鎖。

(3) 可変領域のマウス抗体由来のCDRとその両端のアミノ酸配列が、下記のアミノ酸配列である前記

第(2)項記載の抗HIV改変抗体H鎖。

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxT-TYPEI-WNKQWxx
xxxxxIG-MFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVxxxxxxxxxxxx
xxxxxxxxxxxxxI-HYGSAYANDY-xxxxxxxxxxxx

(xxx..xはヒト抗体由来のアミノ酸配列、下線の部分はCDRのアミノ酸配列)

(4) 該ヒト抗体由来のアミノ酸配列が、ヒト抗体サブグループIに属する抗体のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の抗HIV改変抗体H鎖。

(5) 可変領域が、下記のアミノ酸配列からなる前記第(1)項記載の抗HIV改変抗体H鎖。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF-TYPEI-WNKQWPG
QGLEWIG-MFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVDSTNTAYNELS
SLRSEDTAVYYCAI-HYGSAYANDY-WGQGLTVTVSS

(下線部分はマウス抗体由来のアミノ酸配列)

(6) 抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)活性を有するヒト×マウス改変抗体L鎖であって、相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列がマウスモノクローナル抗体由来の下記のアミノ酸配列であり、フレームワーク領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列であるこ

とを特徴とする組換え抗HIV改変抗体鎖。

CDR1: KASQSVVDYDGD SYNN

CDR2: AASHLES

CDR3: QQSNEDPFT

(7) 可変領域が、下記のアミノ酸配列からなる前記第(6)項記載の抗HIV改変抗体鎖。

DIQNTQSPSSLSASVGDRTITC-KASQSVVDYDGD SYNN-WYQQ
KPGKAPKLLIY-AASHLES-GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP
EDLATYYC-QQSNEDPFT-FGQGTKEVIR

(8) 前記第(1)項記載の抗HIV改変抗体H鎖と、前記第(6)項記載の抗HIV改変抗体鎖とからなる抗HIV改変抗体。

(9) 相補性決定領域およびこれに隣接するフレーム領域の一部が特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列、残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列になるよう遺伝子組換えが行われた遺伝子であり、さらに該ヒト抗体が相補性決定領域を提供するマウス抗体可変領域とアミノ酸配列において高いホモロジーがあるサブグループのヒト抗体から選択されることを特徴とする改変抗体H鎖

をコードする組換え遺伝子とを適当な発現ベクターを用いて動物細胞中で発現させこれを回収することからなる改変抗体の調製方法。

(12) 該H鎖の特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列の領域が、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端6個のアミノ酸配列である前記第(11)項記載の調製方法。

(13) 該特異的マウス抗体が、抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)活性を有する抗体である前記第(9)項または(11)項に記載の調製方法。

(14) 該改変抗体H鎖可変領域のマウス抗体由来のアミノ酸配列が、下記のアミノ酸配列である前記第(13)項記載の調製方法。

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxT-TYPIE-WMKQRxx
xxxxxIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVxxxxxxxxxx
xxxxxxxxxxxxxI-HYGSAYANDY-xxxxxxxxxx

(xxx...xはヒト抗体由来のアミノ酸配列、下線部分はCDRのアミノ酸配列)

(15) 該ヒト抗体由来のアミノ酸配列が、ヒト抗体

をコードする組換え遺伝子を調製し、これを適当な発現ベクターを用いて動物細胞中で発現・回収することからなる改変抗体H鎖の調製方法。

(10) 該特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列の領域が、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端6個のアミノ酸配列である前記第(9)項記載の調製方法。

(11) 相補性決定領域およびこれに隣接するフレーム領域の一部が特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列、残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列になるよう遺伝子組換えが行われた遺伝子であり、さらに該ヒト抗体が相補性決定領域を提供するマウス抗体可変領域とアミノ酸配列において高いホモロジーがあるサブグループのヒト抗体から選択されることを特徴とする改変抗体H鎖をコードする組換え遺伝子と、少なくとも相補性決定領域が特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列であり残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列となるよう遺伝子組換えが行われた改

サブグループIに属する抗体のアミノ酸配列である前記第(13)項記載の調製方法。

(16) 該改変抗体H鎖改変領域が下記のアミノ酸配列からなる前記第(13)項記載の調製方法。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQYFTT-TYPIE-WMKQRPG
QGLEWIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVDTSTNTAYNELS
SLRSEDTAVYYCAI-HYGSAYANDY-WGQGTLLTVSS

(下線部分はマウス抗体由来のアミノ酸配列)

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するエイズ(AIDS)の治療および予防に期待できる新規な組換え抗HIV改変抗体に関する。さらに詳細には、マウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子との融合遺伝子から遺伝子組換え技術を用いて発現され、HIVに対し中和抗体を有する抗HIV改変抗体に関する。さらには、このような有用な改変抗体の新規調製方法に関する。

発明の背景

後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome: AIDS)は、レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するウイルス性疾患である。この疾患は1981年にアメリカで発見されて以来またたく間に世界中に広がり、世界保健機構(WHO)の集計によれば、1987年8月12日時点においてすでに122ヶ国に発生が認められ、患者総数は6万人を越している。わが国においても1987年9月4日時点で50人の患者が確認され、そのうち28人はすでに死亡している。AIDSはこのように急速に世界中に広がりを見せている。

抗HIV治療剤として、現在アジドチミジン(AZT)がある[Nature: 326, p430, (1987)]が、生体の造血組織に対する強い毒性を有するため多くの例で貧血をもたらすことがわかっている。その他、多くの物質が抗HIV剤の候補として研究が行われているが、有効であり且つ安全な抗HIV剤はまだ開発されているとは言えない。また本病予防のための実用可能なワクチン開発に成功したというような報告もない。

代替品としてHIVウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術は、これまでに主としてマウス型モノクローナル抗体において確立されている。ハイブリドーマ等の細胞が産生するモノクローナル抗体は大量にしかも半永久に得られ、原料不足の問題を解消できうる。しかし、ここにおけるモノクローナル抗体は、副作用(マウスモノクローナル抗体をヒトに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用を起こすことが考えられる)をなくす意味から、従来のマウスモノクローナル抗体ではなくヒトモノクローナル抗体でなければならない。

このヒトモノクローナル抗体の作製法には次のようなものがある。(1)ヒト×ヒトハイブリドーマを用いる方法、(2)ある種のウイルス及び化学薬剤等でトランスフォームさせたヒトリンパ球を用いる方法、(3)ヒト×マウスヘテロハイブリドーマを用いる方法、(4)ヒト×マウスヘテロハイブ

このような状況の中で、輸血によってHIV陽性となったサラセミアの患者グループと小児のAIDS及びARC(AIDS関連症候群)のグループにおいて、その臨床と中和抗体の関連についての報告がある[R. Guroffら, J. Immunol., 138, p3731, (1987); R. Guroffら, Pediatric Research, in press]。いずれの場合でも中和抗体の検出できる症例においては臨床症状も軽く良好であるが、中和抗体が検出できない症例においては臨床症状が悪化していることが報告されており、in vivoにおける中和抗体の有効性を示唆している。このように抗HIV中和抗体はin vivoにおける感染の拡大防止や感染細胞の排除に役立つ可能性があり、現在臨床で用いられている抗ウイルス剤等との併用により更に高い効果が得られることが期待される。

従来技術

上記のような抗HIV中和抗体としてAIDSの患者から採取・調製するやり方もあるが、この方法は、倫理的な問題や原材料入手の問題など数多い困難が予想される。そこで、このような高力価血清の

リドーマを親株としたヒト×(ヒト×マウス)ハイブリドーマを用いる方法、(5)キメラモノクローナル抗体[抗原と結合する可変(V)領域はウイルス中和活性を有するマウスモノクローナル抗体から、抗原性あるいは免疫原性及び生理活性に関与する定常(C)領域はヒトモノクローナル抗体からなる、マウス(V)-ヒト(C)キメラモノクローナル抗体]を遺伝子組換えで作製する方法等であるが、これらの方法による成功例は一切報告されていない。

ここで、(1)については融合効率が低いことや適当なミエローマ親株がない、(2)についてはヒトの場合のEBウイルスで得られる抗体産生細胞は主としてIgM産生細胞が多く力価の低い場合が多く実用的でない、またEBウイルス以外には適当なウイルスや化学薬剤がない、さらに、(3)(4)の方法ではこれまでの作製例から考えて、目的のヒト型モノクローナル抗体を高効率に得るまでには多くの困難が予想される(例えば、安定性の問題等)、従って、(5)のキメラモノクローナル抗体法がより実現性の高い方法であると考えられる。

このキメラモノクローナル抗体は、可変(V)領域の原料となるマウスモノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマからクローニングしたそのV遺伝子と、定常(C)領域の原料となるヒト抗体産生細胞等のヒト細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス(V)-ヒト(C)キメラ抗体遺伝子を含むプラスミドベクターを、動物細胞(例えば、マウスミエローマ)宿主中で発現させ、その培養上清中に得られるものである。キメラ抗体に関するいくつかの報告がすでに見受けられる(特開昭60-155132号、特開昭61-47500号)。この方法ではモノクローナル抗体作製のためのリンパ球の原質をヒトに求める必要はなく、HIVのような危険度の高い抗原に対する抗体を作製する場合、特にバイオハザードの面から望ましい。本発明者らも既に抗HIVキメラ抗体の作製に成功している(特開昭63-20255)。しかし、最近の報告[A. F. LoBuglio et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220 (1989)]によればキメラ抗体であってもまだマウスの抗原性が残っており、その副作用や血中

半減期はマウス抗体とヒト抗体のちょうど中間であるという。このようにキメラ抗体にはまだマウスV領域に起因すると思われる抗原性が残っており、この抗原性をできるだけ取り除くことが望ましい。

ところで、抗体の可変領域は抗原結合に強く関与している3つの相補性決定領域(CDR)とそれらの抗原結合部位を支える抗体の構造に関与している4つの骨格(フレーム)部(FR)に分けることができる。そこで、G. WinterはこのマウスV領域の3つのCDRをヒトV領域の4つのFRに遺伝子工学的に移植することにより、キメラ抗体よりさらに抗原性の少ない改変抗体(リシェイプド抗体: reshaped Ab)を作製した(特開昭62-296890号)。

しかし、単純にマウスCDR部分をヒトFR部分に移植しただけでは抗原結合活性を再現できない場合があり、この技術が全ての抗体に適用できるとは言えない。すなわち、改変抗体において抗原結合活性を普遍的に再現するためにはG. Winterのいう方法だけで不十分であり、より普遍的な方法が

必要とされている。

現在までにG. Winterの技術を普遍的に使用できるように改良した例はなく、ましてやHIVに対して中和活性を有する抗HIV改変抗体の作製に成功した例はない。

発明の目的

このような状況において、本発明者らは先に作製した抗HIV中和マウス-ヒトキメラ抗体をG. Winterの技術を用いて改変した。さらに本発明者らは、既にG. Winterが述べた方法をさらに改良し、従来の技術からできる改変抗体より抗体としての結合活性の高い改変抗体を調製することに成功し、より一般的に、どの抗体にも適用できるとされる改変の法則を発見した。

すなわち本発明は、これまでに一切報告されていない抗HIV中和活性を持つ改変抗体およびこのような改変抗体の調製方法を提供するものであり、この新規抗HIV改変抗体からなる副作用の少ないAIDS診断薬、治療薬、予防薬の開発を可能にするものである。および、これを通じて改変抗体の一

般的な調製方法を確認することを目的とする。

発明の構成および効果

改変抗体の調製方法は既にG. Winterらが発表しており、改変抗体の作製例がいくつかある。例えば、マウス抗ハプテン抗体(BI-8)のVH領域の3つのCDRをヒトミエローマ蛋白(HEW)のVH領域のFRに単純に組み込んだ結果、マウスVL領域との組合せでハプテンに対する結合活性が得られた[P. T. Jones, et al., Nature, 321, 522(1986)]。しかしハプテン抗原は分子サイズが小さく、これと結合する抗体の抗原結合領域も限られている。したがってCDRを移植した結果抗原結合サイトが再構築されたのか単に一部のCDRポケットに結合しているだけなのか区別がつけ難い。そこで彼らは次にリゾチームに対する抗体(DI.3)を改変した。BI-8抗体と同様にVH領域の3つのCDRをヒトミエローマ蛋白(HEW)のVH領域のFRに単純に組み込んだ結果、マウスVL領域との組合せでリゾチームに対する結合活性が得られた[W. Verhoeyen, et al., Science, 239, 1534 (1988)]。しかしこの場合、H鎖

だけの改変にもかかわらず結合活性は1/10に低下した。残るCAMPATH-1抗原に対するラット抗体の改変[L. Riechmann, et al., Nature, 332, 323 (1988)]では、最初にH鎖とL鎖ともラット抗体のCDRをヒト抗体(VHはNEW、VLはREI)のFRにそれぞれ単独に移植した結果、ほとんど結合活性は得られなかった(1/40に低下)。その後ラットVHのFR1領域の一部をさらにヒトVHに移植することによって、1/3程度まで回復させた。しかし、薬物投与における安全性あるいは製造コスト等を考えると、活性低下をより小さくすることが望まれる。

以上の結果は、G. Winterらの改変抗体技術が、実際に最も適用されるであろう分子量の大きな抗原に対して、単独にCDRをFRに移植するというだけでは対応できないことを示唆している。すなわち、ハプテンのようなサイズの小さい抗原の場合を除いて、通常の抗原に対しては、この改変抗体の技術はまだ完成しているとは言えない。

本発明者等は前述の抗HIV抗体の改変を行なった結果、実用に耐える中和活性を持った抗HIV改変

抗体の作製に成功し、さらにこの過程においてG. Winterらの改変抗体技術をさらに改良し一般的にどの抗体にも適用できるような方法を見出し改変抗体技術を完成させるに至った。

すなわち、相補性決定領域およびこれに隣接するフレーム領域の一部が目的の結合活性を有する特異的マウス抗体由来のアミノ酸配列であり、残りのフレーム領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列になるよう遺伝子組換えが行われた遺伝子であって、さらに該ヒト抗体が相補性決定領域を提供するマウス抗体可変領域とアミノ酸配列において高いホモロジーがあるサブグループのヒト抗体から選択されることを特徴とする改変抗体H鎖をコードする組換え遺伝子を調製し、これを適当な発現ベクターを用いて動物細胞中で発現させ回収することにより得られる改変抗体H鎖を得た。このようにして得られた改変抗体H鎖とG. Winterの方法に従って調製された改変抗体L鎖とからなる改変抗体の特異的結合活性を分析した結果、本発明の調製方法による改変抗体が、従来の改変抗体と比

較して特異性が高いことを確認した。さらにより好ましい改変抗体調製において、H鎖可変領域の中でマウス由来のアミノ酸配列にする領域としては、少なくともCDRのアミノ酸配列、CDR1に隣接するFR2のN末端5個のアミノ酸配列およびCDR2に隣接するFR3のN末端6個のアミノ酸配列であることが見いだされた。例えば、抗HIV活性を有する改変抗体を調製する場合には、マウス抗体由来のアミノ酸配列にする領域およびアミノ酸配列の好ましい一例としては、下記が挙げられる。

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXT-TYPIE-WNKQNX
XXXXXIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXX-I-HYGSAYANDY-XXXXXXXXXXXX

但し、xxx...xはヒト抗体由来のアミノ酸配列、
下線...の部分はCDRのアミノ酸配列を示す。

そして、ヒト型抗体にする場合の改変抗体の可変領域全体のアミノ酸配列としては、好ましい一例として下記のアミノ酸配列が挙げられる。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFI-TYPIE-WNKQHPG
QGLEWIG-NFHPYSDDTNYNEKFKG-KAKLTVDTSTATYMEIS

SLSEDTAVYYCAI-HYGSAYANDY-NGQGTLVTVSS

但し、下線...部分はマウス抗体由来のアミノ酸配列を示す。

L鎖についても、H鎖と同様にフレーム領域の一部も含めてマウス抗体由来の配列にすることで従来の改変抗体L鎖と較べて活性を向上させることも可能であるが、従来の改変抗体の調製方法で得られたL鎖と上記の本発明により提供されるH鎖とからなる改変抗体でも十分な活性を得ることが可能である。

抗HIV活性を有する改変抗体L鎖を調製する上では、マウス抗体由来のCDRのアミノ酸配列の一例として下記の配列を挙げるができる。

CDR1: KASQSVVDYDGD SYNH

CDR2: AASHLES

CDR3: QQSNEDPFT

さらにヒト型改変抗体にする場合にはL鎖可変領域のアミノ酸として下記のものが挙げられる。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC-KASQSVVDYDGD SYNH-WYQQ
KPGKAPKLLIY-AASHLES-GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQP

EDIATYYC-QQSNEDPFT-FGQGTKVEIKR

(但し、下線は CDR のアミノ酸配列)

最も好ましい改変抗体を作製する上で重要なポイントは、場合に応じて、CDR を提供する V 領域からどの部分のアミノ酸をヒト V 領域に移植するか決定することであり、移植すべきアミノ酸の決定方法の要点が以下、本発明により開示される。

① CDR を移植するためのヒト FR 領域の決定

抗体遺伝子の V 領域にはさまざまな種類のサブグループがあることが知られており、例えば、Kabata [Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987] による分類によればヒトの VH 領域の場合 3 種類、マウス VH 領域で基本的に 4 種類 (詳しくは 11 種類) というように分類される。抗体蛋白の基本構造はさまざまなサブグループ間で保たれているが、詳細には各サブグループ間で異なる。したがって、最終的な結合活性には FR 領域の差異が大きく関与してくると予想される。そこで、FR を提供するヒト V 領域のサブグル

ープは CDR を提供する V 領域のサブグループとホモロジーの高いものの中から選ぶべきである。このホモロジー検索はコンピュータを使って行われる。

ープは CDR を提供する V 領域のサブグループとホモロジーの高いものの中から選ぶべきである。このホモロジー検索はコンピュータを使って行われる。

② VHVL 両ドメインのパッキングに関与するアミノ酸の決定

VHVL 両ドメインは独立して抗原と結合するのではなく、お互いに密接に相互作用し合いながら CDR により抗原結合ポケットを構築している。このパッキングには V 領域のいくつかのアミノ酸が重要である事が知られている [C. Chothia et al., J. Mol. Biol., 186, 651 (1985)]。CDR および FR の一部を移植する際にはこれらのパッキングに関与したアミノ酸に注意する必要がある。

③ CDR 領域構築に関与するアミノ酸の決定

V 領域の個々の CDR はそれぞれ CDR ドメインを構築するのにある決まった構造を取ることが知られている [C. Chothia et al., Nature, 342, 877 (1989)]。この構造は Canonical 構造といわれており、この構造に関与したアミノ酸がいくつか知られて

④ 特異アミノ酸の決定

抗体遺伝子特に V 領域遺伝子は体細胞突然変異を受けることが知られている。これらの突然変異によって、上記の注目すべきアミノ酸以外に CDR ドメイン構造に関与した特異的なアミノ酸が FR 領域の中に生じる事がある。そのようなアミノ酸はアミノ酸の性質 (疎水性親水性、酸性塩基性、分子サイズ等) を比較すれば見つけることができる。また、そのようなアミノ酸が CDR ドメイン構造に関与しているかどうかはコンピュータを用いたモデリングにより容易に推定することができる。

以上示したように CDR を提供する V 領域からこれらの条件を満足させるようにアミノ酸を決定し、これらのアミノ酸を受け入れ側のヒト V 領域に移植すれば、どのような抗体でも改変することが可能である。

変型の改変は V 領域をコードする遺伝子上で、長

鎖オリゴヌクレオチドを用いた特定部位突然変異誘発法により行なうことができる。この方法には数多くのバリエーションがありそのいずれも利用することが可能である [例えば、Methods in Enzymology, Vol. 154 等]。

最後に、本発明の改変抗体調製法で得られた改変された V 領域遺伝子はヒト抗体定常 (C) 領域遺伝子と結合され完全な改変抗体が構築される。改変された V 領域遺伝子はその物理的な性質は何らマウス等の V 領域遺伝子と変わることはなく、既知のキメラ抗体作製法を利用してキメラ抗体を作製する場合と全く同様に、改変された V 領域遺伝子と C 領域遺伝子を結合させることができる。例えば、渡辺らによって既に示された方法 [渡辺ら, Cancer Research, 47, p999-1005, (1987)] や M. Brugge mann [Waldmann R (ed) Monoclonal Antibody Therapy, Prog Allergy, Basel, Karger, 1988, vol 45, pp91] や S. L. Morrison [Advances in Immunology, 44, 65, (1989)] 等の総説に紹介されている方法に準じて行うことができる。また、発現

させる宿主によって動物細胞発現系、大腸菌発現系、酵母細胞発現系などベクター系が異なるが、いずれの場合でも発現可能である。

次に抗HIV改変抗体について説明する。本発明の抗HIV改変抗体は上記に示した改変抗体調製法を用いて構築されたものである。この抗HIV改変抗体の構築には主に4つの過程が必要である。初めに抗HIV抗体を産生する細胞の調製、その細胞からのV領域遺伝子の単離、単離されたV領域のアミノ酸配列をもとにした改変抗体の作製、最後に得られた改変抗体遺伝子の宿主細胞における発現の4つの過程である。以下順を追って説明する。

本発明に用いる抗HIV抗体遺伝子は抗HIV抗体を産生している細胞から調製できる。抗HIV抗体産生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて調製される。例えば、H9/HTLV-ⅢBで示されるウイルス感染細胞株(ATCC No. CRL8543)や、Molt3/HTLV-ⅢB(ATCC No. CRL8602)等の入手可能なウイルス感染細胞より、ウイルス或はウイルス糖蛋白分画(env: gp41,

gp120)を精製し、これを免疫原として用い通常のハイブリドーマを作製する方法でハイブリドーマを作製すれば、抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞を得ることが可能である。更に、このようにして得られた抗HIVマウスモノクローナル抗体産生細胞の中から、HIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を産生している細胞を選択する。HIVの場合、該ウイルス特有の性質から、このような中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることは容易なことではないが、そのような細胞株として本発明者らは、HIVに対して中和活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ54'CB1細胞の確立に成功している[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]。

このような抗HIV中和モノクローナル抗体産生細胞より、抗原結合性を持った抗体遺伝子を通常の遺伝子操作技術により単離することができる。例えば、その細胞の染色体DNAから常法[例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab. (1982)参照]に従ってV領域遺伝子を

クローニングする方法であり、あるいは、その細胞のメッセンジャーRNAを材料として常法[例えば、D.M.Glover編集 "DNA cloning Vol. I" IRLpress (1985)]によりcDNAを合成しV領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V領域遺伝子クローニングのためのプローブとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列[例えば、坂野ら、Nature, 286, p 676, (1980); E.E. Max ら、J. Biol. Chem., 256, p5116, (1981)]を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが出来る。また、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を利用したクローニングも可能である[R. Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833 (1989); W. D. Huse, et al., Science, 246, 1275 (1989)]。本発明者は既にこのような方法により前述の54'CB1細胞から抗HIV中和活性を持ったV領域遺伝子(0.5β V遺伝子)を単離し、マウス-ヒトキメラ抗体の作製に成功している[特願昭63-20255]。これらが本発明の以下の改変抗体遺伝子調製に用いる最も好ましい材

料として挙げられる。

このようにして得られた0.5β V遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列を決定し、前述の改変抗体作製法の4つの条件を満足するようにヒト抗体V遺伝子への移植領域を決定した。その結果、VL領域の場合RL0.5βが、VH領域の場合RH0.5βがそれぞれ最も望ましい改変抗体として作られた(第1図参照)。このVHVL遺伝子の組合せによりCOS細胞で作られた抗体は0.5β エピトープであるBH10ペプチドに結合し、HTLVⅢBウイルスを中和した。

このようにして得られた本発明の抗HIV改変抗体はAIDSの臨床においてこれまでになかった実質的に有効なAIDS治療および予防剤となりうるものである。さらに、本発明の改変抗体調製法は、あらゆる抗体に対して改変抗体への適用を実質的に可能にするものである。

次に、その実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

(1) 抗HIVマウスモノクローナル抗体の作製とその

V領域遺伝子

抗HIVマウスモノクローナル抗体を産生する細胞は、HIVウイルス(HTLV-III B)粒子及び精製したウイルス糖蛋白分画を免疫原として用いて、BALB/cマウスを免疫後、その脾細胞とX63マウスミエローマ細胞を常法により細胞融合して調製した。このハイブリドーマ、54⁺CB1細胞の産生する抗HIVモノクローナル抗体(0.5 β 抗体)はHIVの外被蛋白gp120を認識し、100ng/μlという低濃度でHIV感染を阻止する中和活性を持っている[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]。

この0.5 β 抗体のV領域遺伝子の調製は、54⁺CB1細胞から染色体DNAを抽出し、そのEcoRI(宝酒造製; 以下本実施例で使用した試薬は、特に断わりのない限り宝酒造製あるいは東洋紡製を使用した)で切断して構築した染色体DNAライブラリーからマウスV領域を含んだ[32P]標識合成DNAアプローブ[坂野ら、Nature, 286, p676(1980); E. E. Maxam, J. Biol. Chem., 256, p5116(1981)]を用いてクローニングした(特願昭63-20255)。

の長鎖ヌクレオチド特定部位突然変異誘発法キットはEcksteinらの方法[Taylor, J. W. et al., Nucl. Acids Res., 13, 8749(1985)]をもとにしている。0.5 β VL領域のRLに対する移植部位をコードする長鎖ヌクレオチドをRE1のV領域遺伝子を組み込んである鋳型M13DNAにアニーリングさせた後にdCTPαSを含む溶液中でDNAの伸長・結合を行い、適当な制限酵素(ここではNciI)で鋳型M13DNAを切断、Exonuclease IIIによる鋳型DNAの消化を行なって突然変異したM13DNAのみのストランドを得た(ここまではアマシャムのキットのプロトコールに従って行なった)。さらに本発明者等はさらにこの方法にPCR法を組み合わせて高効率で突然変異させたDNAを得る方法へと改良した。すなわち、Exonuclease III消化産物を鋳型にユニバーサルプライマー(OP:M13mp18の5'側に相補的な配列を持つ)とリバースプライマー(RSP:M13mp18の3'側と同じ配列を持つ)を用いてPCRを行なった。これらのプライマーはともに20pool 使い、PCRの試薬はCETUS社のものを使用した。PCRの条件は、94℃

この0.5 β 抗体のV領域遺伝子は、以下に示す本発明の抗HIV改変抗体調製の材料として使われた。

(2) 0.5 β 改変抗体VL遺伝子の作製① RE1への0.5 β 抗体VL CDRの移植

G. Winterの改変抗体作製方法にしたがって0.5 β 抗体VH領域改変のための移植アミノ酸の選定を行なった。すなわち、G. Winterらが用いているヒトVL FRのアミノ酸配列[RE1 第2図参照: W. Palm and N. Hilschmann Z. Physiol. Chem., 356, 167(1975)]に移植する0.5 β 抗体VL領域のアミノ酸配列の決定を行なった。すなわち、G. Winterの方法通りCDR領域のみをRE1へ移植するようデザインした(RL)。第2図にそのデザインされたRLのアミノ酸配列を示す。

② 改変抗体RLプラスミドの作製

改変抗体RLはアマシャムのキット(Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system version 2 code RPN.1523)とPCR[Saiki, R. G. et al., Science, 239, 487(1988)]を組み合わせたアマシャム-PCR法により行なった。アマシャム

1分、55℃1分、72℃1分で25サイクル行なった。

PCR終了後、産物をBamHI/HindIIIで消化し、アガロース電気泳動により目的のサイズを切りだし、pUC18のBamHI-HindIIIサイトに組み込み、DH5 α (BRL社)に形質転換し、1次スクリーニングとして、突然変異に使用したCDRプライマーを用いてアマシャムキットのプロトコールにしたがってコロニーハイブリダイゼーションを行ない、CDR突然変異に成功しているクローンを選んだ。その結果RL2、45、73の3クローンが3つのCDRとも突然変異していた。さらに、2次スクリーニングとして、得られたクローンよりプラスミドを常法により調製しシークナーゼキット(USB社)を用いてシークエンスを行なった。その結果RL値についてはクローン2、45が正確にCDR移植が出来ていることが判明した。

(3) 0.5 β 改変抗体VH遺伝子の作製(ヒトVH領域サブグループ2を用いた場合)① REVへの0.5 β 抗体VH CDRの移植(Ver. a, b)

G. Winterの改変抗体作製方法にしたがって0.5 β 抗体VH領域改変のための移植アミノ酸の選定を行

なった。すなわち、G. Winterらが用いているヒトFRのアミノ酸配列[ヒトV領域サブグループ2であるNEY図1参照: J. Poljak, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3440 (1974)]に移植する0.5 β 抗体VH領域のアミノ酸配列の決定を行なった。移植する領域として、G. Winterの方法通りCDR領域のみ移植した場合(Ver.a: RHa)と、さらにCanonical構造[C. Chothia et al., Nature, 342, 877 (1989)]を満足するようにFR1とFR3領域の一部も合わせて移植した場合(Ver.b: RHb)の2つのバージョンをデザインした。第1図にそのデザインされたRHa, RHbのアミノ酸配列を示す。実際の改変抗体RHa, RHbは以下の④に示す方法により作製した。

④改変抗体RHa, RHbプラスミドの作製

改変抗体RHa, RHbの作製には初めアマシム-PCR法を試みた。NEYのV領域遺伝子を組み込んだM13 DNAを鋳型にして、第1図に示す0.5 β VH領域のRHa, RHbに対する移植部位をコードする長鎖ヌクレオチドをそれぞれ用いて前述のRLの場合と同様にア

ファージブラックの中から任意に選んだブラックを別のプレートに移し直してM13感染細胞のコロニーを作らせ、CDR2オリゴマーをプローブにコロニーハイブリダイゼーション(前述)を行なった。そのCDR2陽性クローンについてM13RF DNAを調製してシークエンス(前述)を行なった結果、RHa726 clone10, 139の2つが目的のCDR1, 2, 3を持っていることが分かった。

RHbの場合、CDR1のみを持つRHb1, CDR3のみを持つRHb96がアマシム-PCR法で得られたので、CDR2オリゴマーを組み合わせてRammannらが考案した2 step PCR法[Nuc. Acid Res. 17, 5404 (1989)]を用いた特定部位突然変異誘発法を用いることにした。2 step PCR法はPCRを2回繰り返すことにより目的のDNA断片の任意の部分に突然変異を入れる方法である。

第1 PCRはRHb96を鋳型にRSPとCDR2オリゴマーをプライマーにして行なった。PCRの条件は94℃ 1分, 37℃ 1分, 68℃ 3分, で30サイクル行なった。プライマーはともに20pmol使い、PCRの試薬

マシム-PCR法を行なった。その結果いずれの場合も3のCDRがともに移植されたものは得られなかった。RHaの場合、RHa72がCDR1と3を持っていたことが分かったので、これを鋳型にKunkel法[Kunkel, T. A., Methods in Enzymology, 154, 367 (1987); Venkitaraman, A. R., Nuc. Acids Res. 17, 3314 (1989)]を用いた特定部位突然変異誘発法により残りのCDR2部分を移植した。Kunkel法は, dut-, ung-の大腸菌で作られたM13 ファージDNA(デオキシウラシル(dU)を含んでいるためung+の大腸菌のなかでは増殖できない)を鋳型にin vitro mutagenesisを行ない、dUを含まない目的の突然変異M13 DNAを合成し、さらにこれらをung+の大腸菌にトランスフェクションすることによりdUを含まないM13のみを選択的に得るという方法である。

RHa72のV領域遺伝子を持ったM13 DNAをBW313株(dut-, ung-)に感染させてdU-RHa726 ssDNAを調製した。このssDNAにCDR2をコードしているオリゴマーをアニーリング後、伸長と連結を行ない、TG1株(ung+)にトランスフェクションした。得られた

はCETUS社のものを使用した。第1 PCR終了後、アガロース電気泳動により目的のサイズを切りだし、この第1 PCR産物とUPをプライマーにRHb1を鋳型にして第1 PCRと同じ条件で第2 PCRを行なった。PCR終了後、産物をBamHI/HindIIIで消化し、アガロース電気泳動により目的のサイズを切りだし、pUC18のBamHI-HindIIIサイトに組み込み、DB5 α (BRL社)に形質転換した。その後、コロニーハイブリダイゼーションとシークエンス(前述)を行ない、CDR1, 2, 3をもつRHb-PCR82を得た。

(4) キメラ抗体プラスミドの作製

改変抗体のためのコントロールとして、V領域が全てマウスであるキメラ抗体が作られた。0.5 β のVH, VL領域の両端にPCR法を用いてHindIIIとBamHI(VH)あるいはBglII(VL)サイトをそれぞれ付加した後述の発現ベクターに組み込んだ(以下このキメラ抗体をそれぞれCH, CLとする)。PCRの条件は、94℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分で25サイクル行ない、これらのプライマーはともに20pmol使い、PCRの試薬はCETUS社のものを使用した。0.5 β のV

領域の塩基塩基配列とそれに対するPCRプライマーは第3図および第4図に示す。

(5) 改変抗体RH_a, RH_b, RLおよびキメラ抗体CH, CLプラスミドの発現と活性

改変抗体およびキメラ抗体の発現のためにヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のエンハンサー、プロモーター[M. Whittle, et al., Protein Engineering, 1, 499 (1987)]を持った発現ベクターHCMV- α , HCMV- γ 1がそれぞれ使われた。HCMV- α はヒト κ 鎖定常領域遺伝子を持ち、HCMV- γ 1はヒト λ 鎖定常領域遺伝子を持つ。キメラ抗体遺伝子発現用のベクターの構造を第5図および第6図に示す。前述の(4)で作られた0.5 β のV領域CH, CLをそれぞれHCMV- γ 1, HCMV- α のHindIII-BamHIサイトに組み込んだものである。また、RH_a, RH_bおよびRL V領域遺伝子も、CH, CLの場合と同様に、HCMV- γ 1, HCMV- α にそれぞれ組み込んだ。

上記のように構築したプラスミドの持つ抗体活性をCOS7細胞(ATCC CRL 1651)を用いた一時的発現系で検討した。方法はCOS7細胞にプラスミドDN

AをBio-Rad社製のエレクトロポレーション装置を用いて、Bio-Rad社のプロトコールにしたがって導入し、3日間10%牛胎児血清を含むDMEM培地(GIBCO社)で培養し、その培養上清を回収。抗ヒトIgGあるいはBH10ペプチド(0.5 β 抗体のエピトープ)を用いたELISA法(特願昭63-20255号)によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。

結果を第7図に示す。抗体遺伝子発現に関して全ての組合せで蛋白として発現した(第7図b)。しかし、結合活性については、コントロールであるCH \times CLの組合せではBH10ペプチドに結合する抗体が得られたが、改変抗体であるRH α \times RL, RH β \times RLの組合せでは結合活性は得られなかった(第7図a)。このことは、G. Winterの方法にしたがって単純にCDRを移植するだけでは活性が得られない場合があることを示している。また、マウス0.5 β のVHと改変抗体のVLの組合せであるCH \times RLでもキメラ抗体CH \times CLの組合せと同等の結合活性を示した。このことは0.5 β のVL領域に関して改変がうまく行っていることを示している。

(6) 0.5 β 改変抗体VL遺伝子の作製(ヒトVH領域サブグループ1遺伝子を用いた場合)

① SGIへの0.5 β 抗体CDRの移植(Ver. c)

G. Winterの方法通りCDR領域のみ移植した場合(Ver. a: RH_a)および、これに加えてCanonical構造を満足するようにFR1とFR3領域の一部も合わせて移植した場合(Ver. b: RH_b)でも結合活性が得られないことから、ヒトFR領域とマウスFR領域の関係を再検討した。過去にHEWを用いて改変化が成功した抗体のホモロジーを調べてみると、BI-8(58.6%), DI-3(65.5%), CAMPATH(52.9%)となっており、0.5 β の場合は49.4%と低かった。0.5 β 抗体と最もホモロジーの高いヒトのサブグループを検索したところ、サブグループ1であることが分かった。そこで、ヒトサブグループ1のVH遺伝子(SGI, 第1図参照)を以下の実験に使用した。ちなみにこのSGIと0.5 β のホモロジーは64.4%であった。

このSGIと0.5 β 遺伝子のアミノ酸配列を比較し、CDR部分以外に、Canonical構造、VHVLバック

[C. Chothia et al., J. Mol. Biol., 186, 651 (1985)], を満足するように移植領域を選定した。その配列を第1図のRHc0.5 β に示す。

② 改変抗体RHcプラスミドの作製・発現・活性

RHcの作製は、SGIのV領域遺伝子を組み込んだM13DNAを鋳型にして、第1図に示す0.5 β VH領域のRHcに対する移植部位をコードする長鎖ヌクレオチドをそれぞれ用いて前述のRLの場合と同様にアッシュム-PCR法を行なって作製した。その結果、CDRI, 2, 3が完全に移植されたRHc73を得た。このRHc73のHindIII-BamHI断片を前述のHCMV- γ 1ベクターの同サイトに組み込みRHc0.5 β プラスミドを作製した。

このプラスミドと改変VLの組合せ(RHc \times RL)によって得られる抗体活性を前述のCOS7細胞における一時的発現系で検討した。(5)の場合と同様にして遺伝子導入細胞の培養上清を回収。抗ヒトIgGあるいはBH10ペプチド(0.5 β 抗体のエピトープ)を用いたELISA法によりその培養上清に存在する抗体の活性を測定した。その結果、第8図に示す

ようにBH10ペプチドに対する結合活性が得られた。しかしコントロールであるCHxCLの組合せに比べるとかなり活性が低いように思われた。

(7) FR領域の重要性

① RHbとRHeの改良 (Ver. d.e. f.)

SGIのVH領域を用いた結果、改変抗体に結合活性が得られたが、さらに高い活性を与えるためにFR領域内の特異アミノ酸について検討した。移植先のヒト遺伝子をHEWからSGIに変えることによって、0.5βに対するFR領域のホモロジーは49.4%から64.4%に上昇したが、その大部分はFR1領域に寄与するところが大きく、FR2、FR3にはほとんど変化がなかった。したがって、この部分のアミノ酸を再検討しより結合活性の強い改変抗体を作製しようと試みた。FR2の3'とFR3の3'の特異アミノ酸をさらにRHeに移植した。FR2の3'とFR3の3'の特異アミノ酸を持つもの(RHe)と、FR2の3'の特異アミノ酸のみを持つもの(RHf)をデザインした。合わせて、同部分のHEWをベースとしたRHbへの移植も試みた(RHd)。これらのアミノ酸配列を第1図

に示す。

② 改変抗体RHd, RHe, RHfプラスミドの作製・発現・活性

これらの改変VH領域遺伝子は前述のアマシエム-PCR法、Kunkel法、2step-PCR法を適時組み合わせで構築した。構築した改変VH領域遺伝子は前述のHCMV-γ1ベクターに組み込まれ、RHe0.5β, RHf0.5β, RHd0.5βがそれぞれ作られた。これらのプラスミドを前述のCOS7細胞における一時的発現系でその活性を検討した。

その結果、RHexRL, RHfxRLの組合せの順で強い結合活性が得られた(第8図)。この結果より、FR2およびFR3領域の特異アミノ酸が結合活性には必要であることが示された。また、RHdxRLの組合せでも結合活性は検出されなかった(第7図)ことから、0.5β抗体の場合、ホモロジーの高いヒトサブグループを選ぶことがまず重要であると思われる。

(8) 改変抗体の活性

① 競争阻害活性

いえる。

② 中和活性

CEN/LAVの培養上清をウイルス原液($10^{5.5}$ から $10^{6.5}$ TCID₅₀)として使用した。

まず、10TCID₅₀/50μlに調整したウイルス液をアフィニティ精製した抗体、0.5βキメラ抗体、0.5β抗体各50μl(種々の段階希釈したもの)とを96穴の平底プレートにはん種し、37℃で1時間インキュベートした。その後、MT4細胞を 10^4 個/100μl/穴(10×FCS, L-グルタミン3.5~4.0g/l, ペニシリン50u/ml及びストレプトマイシン50μg/mlを含むRPMI1640培地に浮遊したもの)で添加し、5日間培養した。5日後、感染時にしょうじる合胞体形成(シンシチウムフォーメーション)を抗体が阻害するか否かで中和活性を判定した。また、中和活性は合胞体形成を100%阻害する抗体の最低有効濃度として表示した。その結果を下記表1に示す。

0.5β抗体を改変化することに成功したが、このRHexRLの作る改変抗体がオリジナルのマウス0.5β抗体に比べてどの程度の活性を持つのか、その能力を競争阻害実験により検討した。BH10ペプチドを固定したプレートに、インディケーターとしてのペルオキシダーゼ標識マウス0.5β抗体(マレイミド法にしたがって作製)と競合抗体としての各種抗体(CHxCL, RHexRL, RHfxRL, RHdxRL, ヒトポリクローナル抗体)を混合して加え、37℃2時間反応させた後にTMBZ(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン: 同化学)で発色させた。その結果を第9図に示す。最終濃度0.04μg/mlのペルオキシダーゼ標識マウス0.5β抗体に対して競合抗体の抗体濃度を順次変えていったところ、CHxCLのキメラ抗体はマウス0.5β抗体とほぼ同じ軌跡を示した。また、RHexRLおよびRHfxRLの作る抗体も競合した。抗体濃度から計算してRHexRLおよびRHfxRLはオリジナルの0.5β抗体に比べてそれぞれ約1/2、1/4の活性を持っていることが示された。RHexRLの約1/2は過去の改変抗体の成績に比べると最もいい値と

表 1

モノクローナル抗体	ウイルス中和活性 ¹⁾
RHe × RL	50.0
RHe × RL	6.2
RHe × RL	50.0
CH × CL	3.1
0.5β	3.1

1) ウイルス感染100%阻害する抗体の最低有効濃度 (μg/ml) として表わした。感染価は10TCID₅₀/50μlとした。

オリジナルである0.5β抗体及び0.5βキメラ抗体 (CH×CL) は、3.1μg/ml の濃度でウイルス感染を100%阻害するが、改変抗体については、RHe×RLにおいて6.3μg/ml の濃度でウイルス感染を100%阻害していることが判る。この改変抗体RHeRLの融合阻害活性は前述したように、0.5β抗体及び0.5βキメラ抗体の約1/2の活性を示すが、中和活性においてもオリジナル抗体の1/2活性を示すことがわかる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、マウス0.5β抗体、ヒト抗体HEM、SG

および、各種改変0.5β抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

第2図は、マウス0.5β抗体、ヒト抗体HEIおよび改変0.5β抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

第3図は、マウス0.5β抗体のVH領域遺伝子のDNA塩基配列およびキメラ抗体遺伝子作製のためのPCRプライマーの配列とその位置を示したものである。

第4図は、マウス0.5β抗体のVL領域遺伝子のDNA塩基配列およびキメラ抗体遺伝子作製のためのPCRプライマーの配列とその位置を示したものである。

第5図および第6図は、それぞれ0.5βキメラ抗体H鎖遺伝子およびL鎖遺伝子を含む発現型プラスミドの一例を示したものである。

第7図および第8図は、それぞれ0.5βキメラ抗体および各種改変抗体のELISAアッセイの結果の一例を示したものである。

第9図は、0.5βキメラ抗体および各種改変抗体

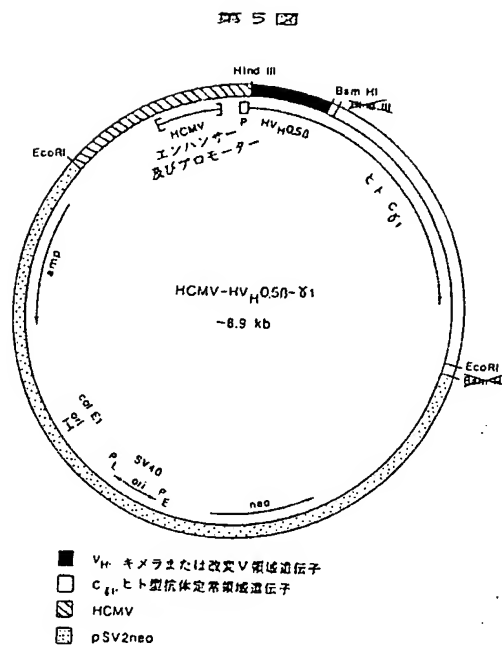
の融合阻害実験結果の一例を示したものである。

特許出願人 財団法人 化学及血清療法研究所

表 1 (続)

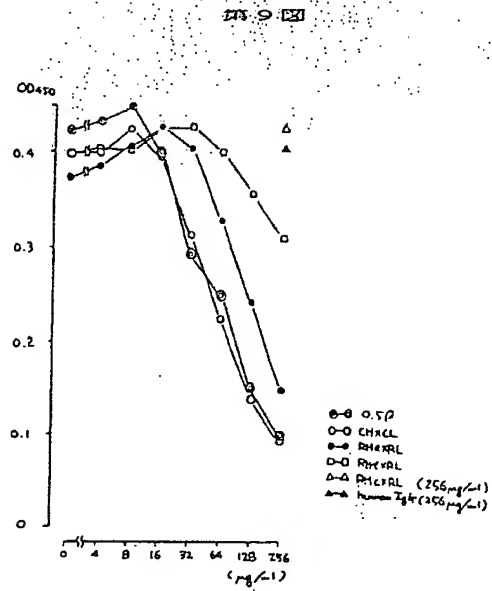
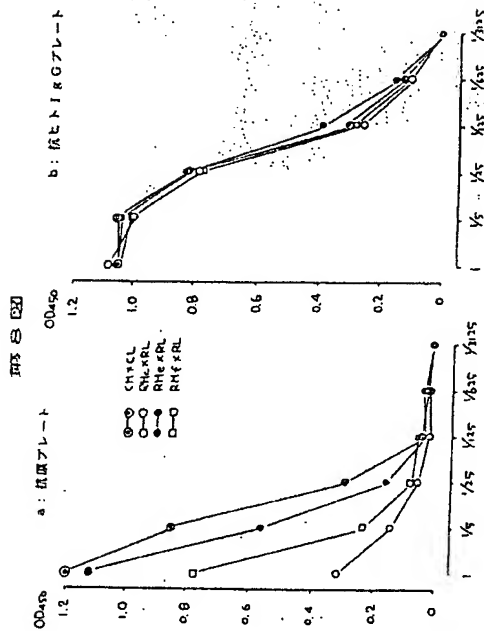
アミノ酸	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
0.5β	12145678901234567890123456789012345	12345	67890123456789012345	0122223456789012345	ABC
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
SG1	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
0.5β	12145678901234567890123456789012345	12345	67890123456789012345	0122223456789012345	ABC
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
SG1	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
0.5β	12145678901234567890123456789012345	12345	67890123456789012345	0122223456789012345	ABC
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
RHe-0.5β	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	
SG1	QVQLQSGAEIVKPCASVMSCKAFGVTFT	TYPE I	WMQRRCGLSLEWIG	NEHP YSDOTRYNEAFPG	

7 3 / 6	FR1	1	2	CDR1	3	ABCEDEF	456789012345678901234	567890123456789	FR2	4	5	CDR2	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488
---------	-----	---	---	------	---	---------	-----------------------	-----------------	-----	---	---	------	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------



3 3

ATGCAATCTGTGGCACTCAGTGAATTATAGAAAGACTGATCTTATCGGTTATATAGG
1
TAGCTTTAGGACAGCTGAGTCACTAATACTCTCTCTGACTAGMATAGCCAAATATATCC
60
ATGCTACACCCACAAAACATAGATCAGTCTCTCTATATCATCTAGTGCGACAGGAC
120
TACAGATGTGGGGTGTTTGTATTCTAGTCAGAGAGATATTAGTGAAGTCTGCTCTC
5'-TACAGCTT
CTCACATGCTGGGATCTCTATCATCTCTCTCTAGTGGGACACTATAGTAGGGG
121
GAGTTTACCCACACTAGAGATAGTAGAGAAAGCATCCGTTCTGATCTCCATCCCC
GCCACCATGGCTGGATCTCT-3'→
CTCACAGTTTCNACTTCACGAGGCGCATACATCTATGTGACATCTACTCTGCTTTCT
180
GAGTGTCAAGTTTGAAGTCTCTCTCGGTATGTGATGACTGTAGTAGAGCGGAAGA
240
CTCCACAGTGTGCCACTCCGAGGTTCCAGTCCAGCAGTCTGGGGCTGAGTGTGAAACC
241
GAGGTGCCACAGCTGAGGGTCCAGCTGAGCTGCTGACGCCGAGCTCGACCACTCGG
300
TGGGGCTCAGTCGAGATGCTCTCGCAAGGCTTTTGCTACACTTCACTTACCTATCCAT
301
ACCCGGAGTCACTTCTCAGGAGGTTCCAAACCGATGTGGAAATGATGATAGGTTA
360
AGAGTGATCAACAGAAATCATCGGACAGCTTAGAGTGAAATTTTCATCTTTA
361
TCTCACTACTTTGCTTAGTACCTCTCGGATCTCACTTCACTTTTAAAGTAGGAAT
420
CAGTGTGATTAATACTACTACATCAAAAATCAAGGCCAAGCCAAATTGACTGTAGAAA
421
GTCACTACTATGATTCATCTTTTAAAGTTCCGTTTCCGGTTTAACTGACATCTTTT
480
ATCTCTAGCACAGTCTACTTGGATTCACCGGATTTACATCTGATGACTCTGCTGTTTA
481
TAGGAGATCTGTGATGATGAATCTTCAGTCGGCTAAATTTGAGACTACTGAGACGACAA
540
TTACTGTGCATACTACCTACGGTAGTGGCTACGCTATGGACTACTGGGTCAAGGACCTC
541
AATGACAGTATTGATGATGCATCAGGATGGCTAGCTTCTGATGACCCGACTGCTGGAG
BamHI
←3'-TGGCAGAGTCTCACTCACTCACTAGT-5'
AGTACCGCTCTCTCACTAGTTTAAAGATGGCT
601
TCAGTGGCAGGGAGTCTCAATTTCTACCGCA
631
V-C ステラース



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 5		識別記号	庁内整理番号
C 07 K	15/12		7731-4H
	15/28		7731-4H
C 12 N	15/13	ZNA	
// A 61 K	39/395	ADY	S 8829-4C
G 01 N	33/569		H 9015-2J
	33/577		B 9015-2J
(C 12 P	21/08		
C 12 R	1:91)		